茄科作物檢疫病毒與類病毒檢測平台在植物防檢疫之應用

鄭櫻慧 [1,*]　林雅雯 [1]　陳金枝 [1]　王昭月 [2]　林鳳琪 [3]

[1] 行政農業委員會農委會農業試驗所植物病理組。台灣 台中市。

[2] 行政農業委員會農委會農業試驗所生物技術組。台灣 台中市。

[3]行政農業委員會農委會農業試驗所應用動物組。台灣 台中市。

摘要

茄科作物包含番茄、番椒、茄子與馬鈴薯等重要經濟作物，許多重要之病毒與類病毒會藉由茄科種子攜帶傳播，造成作物嚴重損失。國際間茄科種子貿易頻繁，國外輸入種傳病原風險將急劇升高。動植物防疫檢疫局根據風險評估結果針對輸入茄科種子種苗擬定國際間 6 種重要檢疫類病毒，包括馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒 (potato spindle tuber viroid, PSTVd)、番茄褪綠矮化類病毒 (tomato chlorotic dwarf viroid, TCDVd)、鯨魚藤潛隱類病毒 (Columnea latent viroid, CLVd)、番椒小果類病毒 (pepper chat fruit viroid, PCFVd)、番茄莖頂矮化類病毒 (tomato apical stunt viroid, TASVd) 和番茄植株雄化類病毒 (tomato planta macho viroid, TPMVd) 與 4 種病毒，包括番茄褐色皺果病毒 (tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV)、番茄斑駁嵌紋病毒 (tomato mottle mosaic virus, ToMMV)、香瓜茄嵌紋病毒 (pepino mosaic virus, PepMV)及番茄黃化捲葉病毒 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 為進口檢疫項目。農試所建立之上述 10 種病毒與類病毒之核酸檢測平台，除了應用於邊境監測之進口茄科種子檢測，也使用於田間監測，防止國內尚未發生的茄科重要病毒及類病毒傳播進入我國造成危害，提升我國茄科種子種苗之國際競爭力並確保茄科產業持續發展。

關鍵詞： 茄科、馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒、番茄褪綠矮化類病毒、鯨魚藤潛隱類病毒、番椒小果類病毒、番茄莖頂矮化類病毒、番茄植株雄化類病毒、番茄褐色皺果病毒、番茄斑駁嵌紋病毒、香瓜茄嵌紋病毒、番茄黃化捲葉病毒

*論文聯繫人

E-mail: yhcheng@tari.gov.tw

前言

茄科作物是目前全球重要的經濟作物之一，也是台灣重要的蔬菜作物。茄科蔬菜主要包括番茄、番椒、茄子及馬鈴薯，其中番椒又可分為甜椒及辣椒二類。根據 109 年農業統計資料，種植面積達 10,556 公頃，產值約 6,697,000 千元。110 年番茄種子出口值即接近 4 千萬元，僅次於果樹種子與西瓜種子，排行第 3，是我國種子產業主力。國際市場調查也評估，2020 年至 2025 年全球番茄種子總需求量還有上升 7.9%的空間，相對的，番茄種傳病原檢疫的需求預估也會日漸提高。

感染茄科作物的病毒中，可以種子帶毒或經由種子傳毒的病毒超過26種，類病毒有9種，其中*Tobamovirus*屬的番茄褐色皺果病毒 (tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV)、番茄斑駁嵌紋病毒 (tomato mottle mosaic virus, ToMMV)；Potexvirus屬的香瓜茄嵌紋病毒 (pepino mosaic virus, PepMV)；*Nepovirus*屬的番茄輪斑病毒 (tomato ringspot virus, ToRSV) 等病毒和馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒 (potato spindle tuber viroid, PSTVd)、番茄褪綠矮化類病毒 (tomato chlorotic dwarf viroid, TCDVd)、鯨魚藤潛隱類病毒 (columnea latent viroid, CLVd)、番椒小果類病毒 (pepper chat fruit viroid, PCFVd)、番茄莖頂矮化類病毒 (tomato apical stunt viroid, TASVd) 和番茄植株雄化類病毒 (tomato planta macho viroid, TPMVd)、菊花矮化類病毒 (chrysanthum stunt viroid, CSVd)等7種類病毒為國際間檢疫常見項目。我國已將 ToBRFV、ToMMV、PepMV、TYLCV等4病毒與 PSTVd、TCDVd、CLVd、PCFVd、TASVd及TPMVd等6類病毒 (表 1) 列為茄科種子進境檢疫項目。

種子傳播的病毒 ToBRFV、ToMMV、PepMV 不侵入種子內部，以汙染種殼方式藉由種子進行長距離傳播，也可藉由嫁接等操作在種苗間傳播。不同於前述 3 種病毒，國外有報告指出 TYLCV 存在種子內部 (Kil *et al.* 2016)。種子傳播類病毒的特性為侵入種殼內的胚乳及胚軸等部位，無法藉由表面消毒去除。類病毒會造成作物產量減少引起嚴重的經濟損失，但因感染作物種類或品種不同，而引起嚴重病徵，除了種子之外，類病毒亦可藉由無性繁殖、機械傳播及花粉傳播。因病毒與類病毒病害無法以藥劑防治，因此在防治上以拒病及除病為主要防治方法，拒病主要是藉由檢疫、種子檢查與清潔種苗為主要方法，可以阻止新的病蟲害從疫區傳播到新的地區造成危害。目前台灣仍非 ToBRFV、ToMMV、PepMV、TYLCV、PSTVd、TCDVd、CLVd、PCFVd、TASVd 及 TPMVd 之疫區，因此防檢局將其列為進境檢疫項目，以維持非疫區地位，避免病毒與類病毒入侵對產業造成危害。

簡介檢疫病毒與類病毒

馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒、番茄褪綠矮化類病毒、鯨魚藤潛隱類病毒、番椒小果類病毒、番茄莖頂矮化類病毒和番茄植株雄化類病毒等 6 種類病毒

列茄科作物檢疫榜的有馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒 (PSTVd)、番茄褪綠矮化類病毒 (TCDVd)、鯨魚藤潛隱類病毒 (CLVd)、番椒小果類病毒 (PCFVd)、番茄莖頂矮化類病毒 (TASVd) 和番茄植株雄化類病毒 (TPMVd) 等 6 種 (Verhoeven *et al.* 2006, 2009)，都屬於 *Pospiviroid* 屬，由單鏈環狀的微小裸露 RNA 組成，病原分子有高度互補的二級結構因此非常穩定。PSTVd 早在 1920 年代就發現於美國，是最早被發現的類病毒 (De Hoop *et al.* 2008)。6 種類病毒之中，除了 PSTVd 和 CLVd 之外，其他 4 種類病毒危害作物局限於茄科植物；PSTVd 的寄主除了茄科作物之外，主要還有樟科的酪梨 (*Persea Americana* M.) (Querci *et al.* 1995)，而 CLVd 除了茄科寄主，還感染大岩桐 (*Gloxinia* sp.) 等。類病毒可以經由汙染種子或侵入種殼內的胚乳胚軸等部位 2 種方式種子傳播，侵入種殼內的類病毒無法藉由表面消毒去除。除了種子之外、無性繁殖、花粉、嫁接、授粉昆蟲及機械性傷口也可以傳播類病毒。類病毒對植物造成的影響因品種而異，因感染作物種類或品種不同，引起病徵程度不一: (1) 植株頂端生長緩慢及黃化，隨後植株矮化及葉片變紅或變紫，當植株矮化時，花及果實也停止生長。(2) 植株生長正常，但嚴重影響開花結果或塊根生長。(3) 無病徵感染，不影響生長與產量。其中尤以無病徵或輕微感染的寄主植物，類病毒可藉其生產的種子散佈。與病毒病害相同，類病毒病害也無法以藥劑防治，因此在防治上以拒病及去除病原為主要防治方法，拒病主要是藉由檢疫及種子檢查為主要方法，拒絕新的病蟲害從疫區傳播到新的地區造成危害。

番茄褐色皺果病毒與番茄斑駁嵌紋病毒

番茄褐色皺果病毒 (ToBRFV) 與番茄斑駁嵌紋病毒 (ToMMV) 都是 *Tobamovirus* 屬病毒。自然界發現危害茄科作物病毒計有 12 種之多，其中的 ToBRFV 與 ToMMV 因為可以克服番茄重要的抗病基因 Tm-2[2]，而受到國際間高度重視 (Nagai *et al.* 2019)。ToBRFV 最早於 2015 年約旦發現的病毒 (Salem *et al.* 2016)，除了約旦之外，加拿大、墨西哥、美國、德國、希臘、義大利、英國、以色列、中國、及北巴勒斯坦都有發現 ToBRFV 的報告。 ToMMV 則於 2013 年墨西哥發現的病毒 (Li *et al.* 2013)，目前美國、中國、以色列和西班牙也有發生報告。ToBRFV 主要感染番茄及番椒屬植物，ToBRFV 在番茄植株上引起嚴重或輕微不等的病徵，病徵嚴重程度取決於特定栽培品種、感染時間、寄主的發育階段和環境條件等。在葉子的病徵，最常見的是葉子出現嵌紋，靠近

頂端的較嫩葉片出現褪綠斑駁和葉子變形。有些報告指出病毒感染引起莖、花梗和花萼局部壞死，有時花朵也會受到影響出現萎凋。果實最常見的症狀著色不均的黃綠色大理石狀斑塊。帶有變色和變形的褐色皺紋病徵的嚴重程度取決於栽培品種、感染時間和可能的環境條件。ToMMV 的寄主範圍為茄科、莧科及馬鞭草，感染的番茄植株葉片變形、嵌紋、斑駁和壞死，在接種試驗中，感病番茄嚴重矮化，落花，著果不良。中國大陸的番椒作物的爆發 ToMMV 引起病害，受影響的植物表現出葉斑、萎縮和壞死。ToBRFV 與 TMMV 的傳播方式有手、衣物、刀具設備等造成的機械傷口、種子、花粉及無性繁殖等，因病毒顆粒穩定，使設施栽培之番茄番椒易受汙染棚架設施傳毒而感染，露天栽培者容易因授粉昆蟲攜帶病毒感染，各國莫不努力尋找有效的抗應基因。

香瓜茄嵌紋病毒

香瓜茄嵌紋病毒 (PepMV) 為 *Potexvirus* 屬病毒，原發生於秘魯 (Jones *et al.* 1980)，1999 年在荷蘭與英國發現，之後傳遍歐洲、美洲與亞洲等地 (Jordá *et al.* 2001；French *et al.* 2001)。PepMV 主要寄主為茄科植物，例如番茄 (*S. lycopersicum*)、茄子 (*S. melongena*) 香瓜茄 (*S. muricatum*) 及馬鈴薯 (*S. tuberosum*) 與唇形科的羅勒 (*Ocimum basilicum*) (Blystad *et al.* 2015)。PepMV 引起的病徵非常多變，植株感染初期葉片將出現黃化斑點、起泡、褪綠，接著老葉可能會出現黃化角斑，心葉出現輕微捲曲，莖頂、葉柄出現壞疽，果實著色不均出現大理石斑紋與裂果，使果實失去經濟價值。PepMV 症狀的嚴重程度是依環境、病毒分離株與栽培品種而有不同。PepMV 以器械接觸進行短程傳播。受感染植株的根部受損或死亡時，病毒顆粒很可能會釋放到土壤或排水中，成為感染原。PepMV 也可藉由種子、花粉進行較長距離傳播 (Hanssen *et al.* 2010)。

番茄黃化捲葉病毒

番茄黃化捲葉病毒 (TYLCV) 屬於 *Geminiviridae* 科 *Begomovirus* 屬。於 1959 年於以色列首次發現，1970 年代於中東地區爆發流行，之後逐漸擴散至亞洲、非洲、北美洲、中南美洲、歐洲、大洋洲等各大洲，目前已有超過 70 個國家遭受危害 (Navot *et al.* 1981)。TYLCV 感染番茄導致植株的幼葉和枝條嚴重發育不良，新芽叢生、植株矮化。感病植株的葉緣向上和向內捲曲、小葉葉脈間變黃和明顯的植株發育不良。TYLCV 感染顯著降低著果率，尤其是在開花期發生感染時。受感染植株的果實沒有明顯的症狀，但果實會變小。TYLCV 主要寄主為番茄 (*S. lycopersicum*)，自然界其他寄主還包括茄子 (*S. melongena*)、馬鈴薯 (*S. tuberosum*) 及番椒 (*Capsicum annuum, C. frutescens*)、煙草 (*Nicotiana tabacum*)、豇豆

(*Phaseolus vulgaris*)、矮牽牛（*Petunia hybrida*）和桔梗(*Eustoma grandiflorum*)，數種野生番茄為無病徵寄主。在歐洲塞浦路斯進行的一項調查顯示，包含 15 科 49 種的植物為 TYLCV 的寄主。自然界中 TYLCV 主要由煙草粉蝨以永續型方式傳播，帶毒粉蝨的卵中可測到 TYLCV，但未有明確證據證明 TYLCV 可經由粉蝨的卵傳至子代。TYLCV 無法機械傳播。2016 年韓國學者報告番茄黃化捲葉病毒-IL (TYLCV-IL) 感染之番茄、番椒與豆類等作物時，TYLCV-IL 可以經由種子傳播，種胚內也可測到病毒存在 (Kil *et al.* 2016 ; 2017)，但其他學者未能重複此試驗，推測種子傳毒可能只限於特定分離株 (P´erez-Padilla *et al.* 2020)。

核酸檢測平台之建立

病毒的鑑定方法有很多，早期多以病毒形態、病徵、血清學分析等方式進行，尤其是 ELISA，已被廣泛作為用於植物病毒的免疫檢測方法，它的優點有可以處理大量樣本、高靈敏度、使用方便快速和定量檢測，其缺點是同屬病毒種間親緣性高，容易造成病毒鑑定的誤判。隨著分子生物學檢測技術的進步，以病毒基因體做為偵測標的變得普遍，最常用的診斷技術是 PCR 或 RT-PCR，還可以用於區分同一病毒群中的特定和非特定成員。由於它們的靈敏度高，還可以克服植物組織中低病毒濃度的問題。4 種茄科檢疫病毒中，TYLCV 所屬的 *Begomovirus* 病毒屬因病毒濃度關係，不易以 ELISA 檢測，以 PCR 為檢測主力。PepMV 屬於 *Potexvirus* 病毒屬，本屬病毒適用 ELISA 或 RT-PCR 等核酸檢測。*Tobamovirus* 病毒屬的 ToBRFV 與 ToMMV 適用 ELISA 或 RT-PCR 等核酸檢測，但 ToBRFV、ToMMV 與番茄上常見的番茄嵌紋病毒 (tomato mosaic virus, ToMV) 因為基因體相同度約為 81%，而被分類成不同病毒，但其鞘蛋白相同度高於 90%，與傳統上以鞘蛋白免疫白兔製備的多元抗體反應，產生的交叉反應不意外非常強烈 (Letschert *et al.* 2002)，因此很難以 ELISA 等免疫方法檢測，以具有專一性的單株抗體或利用核酸相同度低的區域設計引子之核酸檢測法才能避免病毒相互干擾，為可行的檢測方法，但單株抗體製備耗費時日。因此根據基因體核酸差異大的區域設計對，建立 ToBRFV 與 ToMMV 專一性核酸檢測系統，為實務上可行方法。

類病毒僅只由 RNA 組成，無法以抗血清來進行檢測，已知的檢測方法包含生物檢定法、核酸雜合法 (Welnicki & Hiruki 1992)、反轉錄-聚合酶連鎖反應、即時聚合酶連鎖反應、定量即時聚合酶連鎖反應及恆溫環狀擴增反應等 (Mumford *et al.* 2000)。近年來以反轉錄-聚合酶連鎖反應與即時聚合酶連鎖反應於類病毒檢測上應用最多。使用生物檢定法需有合適的寄主，在檢測上較為費時耗工，不適用於快速檢測。核酸雜合法雖可以靈敏且準確的用來檢測已知的類病毒，但操作

過程較為繁複，且可能無法檢測新種類病毒。近年來類病毒之檢測技術多是發展 RT-PCR 技術的延伸，例如以專一性引子對檢測單一類病毒 (Joung *et al.* 1997)、以多組專一性引子對同時檢測多種類病毒(multiplex PCR)(Ito *et al.* 2002；Levy *et al.* 1992) 、單管單步驟進行的 one tube-one step RT-PCR 檢測多屬類病毒以及 Real-time RT-PCR 檢測 Posipiviroid 屬類病毒 (Boonham *et al.* 2004；Monger *et al.* 2010；Shamloul *et al.* 2002) 。RT-PCR 也是目前最常用來檢測類病毒的方式，利用類病毒高度保留區域設計簡併式引子對 (degenerated primer) 可用來檢測是否感染類病毒，或是使用專一性引子對來確認，此檢測方法可用來偵測雖感染類病毒卻無病徵之植株，有效地監測類病毒在田間的危害。

農試所已建立上述 10 種茄科種子種傳病毒與類病毒檢測系統，包含廣效性或種別專一性核酸檢測試劑，配合建立的改良茄科種子核酸萃取方法，得到快速準確穩定的檢測結果 (圖 1)。109 年開始執行進口邊境檢查，防止病毒與類病毒輸入我國而造成危害 (圖 2)。

檢測平台在植物防檢疫之應用

依據防檢局 110 年頒布之「茄屬及番椒屬種子輸入檢疫條件」，對於輸入茄科種子種苗進行國際間重要及新興病害包括 ToBRFV、ToMMV、PepMV、TYLCV 等 4 種病毒與 PSTVd、CLVd、TASVd、TCDVd、TPMVd、PCFVd 等 6 種類病毒進行邊境檢測。採樣種子數量由各機場之海關檢疫人員依 ISTA 規定採樣，採樣種子寄至中興大學或農試所進行病毒與類病毒檢測。因通過檢測之種子才能放行輸入，此檢測為在 10 工作天內完成之急件。檢測時以 100-200 顆種子為一樣本，種子磨碎後 (Li & Trick 2005) 再以市售核酸萃取試劑組進行核酸之萃取，得到快速穩定汙染率低之適用於種子總量 DNA 與 RNA。以此總量 DNA 與 RNA 為模板，進行以各檢測對象之專一性引子進行 PCR 或 RT-PCR，反應產物進行電泳分析，判讀種子是否攜帶監測之病毒或類病毒。未檢出之樣品即時通知寄件分局辦理後續放行事宜。檢出之樣本再行回收 PCR 或 RT-PCR 產物，進行定序確認。定序確認之樣品即時通知寄件分局辦理後續事宜。

田間監測之檢測標的與輸入種子檢測相同。監測工作由防檢局、各改良場所與農試所合作進行。樣本採集依據各改良場所轄區番茄、番椒與茄子等茄科作物栽培面積規劃採集點，每一採集點視栽培面積採 10–20 個樣本，樣本總類數量與採集點座標登錄於雲端。採集樣本寄至農試所進行病毒與類病毒檢測。以每 1 監測點 10 個樣本混合成 1 樣本，以市售核酸萃取試劑組進行 DNA 與 RNA 之萃取，得到快速穩定汙染率低之適用於種子總量核酸。以此總量核酸為模板，進行以各檢測對象之專一性引子進行 PCR 或 RT-PCR，反

應產物進行電泳分析，判讀種子是否攜帶監測之病毒或類病毒。檢出之樣本則回收 PCR 或 RT-PCR 產物，進行定序確認。確定檢出採集點樣本再逐一萃取 DNA 與 RNA，得到單一樣本總量核酸，進行 PCR 或 RT-PCR 檢測，了解監測點之感染率。檢測結果亦於雲端登錄， 使防檢局能盡速採取應對措施。

結論

茄科作物的病害種類繁多，許多重要之病毒與類病毒病原會藉由茄科種子攜帶傳播，一批種子中即使只有極少量的種子攜帶病原，但輸入後種植於本田，將會成為感染源，進行二次擴散感染，增加防治費用之外，也造成農作物嚴重損失。在國際物流迅速與全球化下的大環境下，國外輸入之植物種類趨向繁雜與多樣性，且輸入國別持續增加，國內尚未發生之疫病蟲害侵入風險將急劇升高。因病毒與類病毒病害無法以藥劑防治，因此在防治上以拒病及除病為主要防治方法，拒病主要是藉由檢疫、種子檢查與清潔種苗為主要方法，可以阻止新的病蟲害從疫區傳播到新的地區造成危害。危害茄科作物的病毒與類病毒之中，ToBRFV、ToMMV、PepMV、TYLCV、PSTVd、TCDVd、CLVd、PCFVd、TASVd 及 TPMVd 為國際貿易常見檢疫項目，目前台灣仍為這些病毒與類病毒的非疫區，這些重要茄科作物種子傳播之病毒與類病毒病原若進入與立足於我國，將對番茄及番椒等茄科產業造成衝擊。若淪為疫區，也將影響外銷茄科種子品質與競爭力。因此防檢局依據風險評估，於 110 年 2 月將這 10 種病毒與類病毒列為進境檢疫項目。邊境檢測在正式公告前的 109 年 9 月起即針對輸入茄屬及番椒屬種子及種苗進行取樣監測，監測至今已發現多批番茄、番椒、茄子或 矮牽牛種子被檢出檢疫規定之有害生物，阻絕這些有害生物進入與立足。

參考文獻

Blystad D.-R., R. Van der Vlugt, A. Alfaro-Fernández, M. Carmen Córdoba, G. Bese, D. Hristova, H. Pospieszny, N. Mehle, M. Ravnikar, L. Tomassoli, C. Varveri, and S. L. Nielsen. 2015. Host range and symptomatology of Pepino mosaic virus strains occurring in Europe. Eur. J. Plant Path. 143:43–56.

Boonham, N., L. González Pérez, M. S. Mendez, E. L. Peralta, A. Blockley, K. Walsh, I. Barker, and R. A. Mumford. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. J. Virol. Methods 116:139–146.

De Hoop, M. B., J. T. J. Verhoeven, and J. W. Roenhorst. 2008. Phytosanitary measures in the European Union: a

call for more dynamic risk management allowing more focus on real pest risks. Case study: Potato spindle tuber viroid (PSTVd) on ornamental Solanaceae in Europe. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 38:510–515.

French, C. J., M. Bouthillier, M. Bernardy, G. Ferguson, M. Sabourin, R. C. Johnson, C. Masters, S. Godkin, and R. Mumford. 2001. First report of Pepino mosaic virus in Canada and the United States. Plant Disease 85:1121.

Hanssen, I. M., R. Mumford, D.-R. Blystad, I. Cortez, B. Hasiów-Jaroszewska, D. Hristova, I. Pagán, A.-M. Pereira, J. Peters, H. Pospieszny, M. Ravnikar, I. Stijger, L. Tomassoli, C. Varveri, R. van der Vlugt, and S. L. Nielsen. 2010. Seed transmission of Pepino mosaic virus in tomato. Eur. J. Plant Path. 126:145–152.

Ito, T., H., Ieki, and K. Ozaki. 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 106:235–239.

Jones, R. A. C., R. Koening, and D. F. Lesemann. 1980. Pepino mosaic virus, a new Potexvirus from pepino (Solanum muricatum). Ann. Appl. Biol. 94:61–68.

Jordá, C., A. Lázaro-Pérez, P. Martínez-Culebras, and P. Abad. 2001. First report of Pepino mosaic virus on tomato in Spain. Plant Disease 85:1292.

Joung, Y., J. Jeon, K. Choi, H. Kim, and H. Joung. 1997. Detection of Potato spindle tuber viroid using RT-PCR technique. Kor. J. Plant Pathol. 13:205–209.

Kil, E. J., J. Park, H. S. Choi, C. S. Kim, and S. Lee. 2017. Seed Transmission of Tomato yellow leaf curl virus in White Soybean (Glycine max). Plant Pathol. J. 33:424–428.

Kil, E. J., S. Kim, Y. J. Lee, H. S. Byun, J. Park, H. Seo, C. S. Kim, J. K. Shim, J. H. Lee, J. K. Kim, K. Y. Lee, H. S. Choi, and S. Lee. 2016. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. Sci. Rep. 6: 19013.

Levy, L., A. Hadidi, and S. M. Garsney. 1992. Reverse transcription polymerase chain reaction assays for

the rapid detection of citrus viroids using multiplex primer sets. Proc. Int. Soc. Citricult.106:800–803.

Letschert, B., A. Gu¨nter, L. Dietrich-Eckhardt, P. Willingmann, and C. Heinze. 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. J Virol Methods 106:1–10.

Li, R., S. Gao, Z. Fei, and K. S. Ling. 2013. Complete genome sequence of a new tobamovirus naturally infecting tomatoes in Mexico. Genome Announcements 1: e00794-e00713.

Li, Z. and H. N. Trick. 2005. Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. BioTechniques 38:872–876.

Monger, W., J. Tomlinson, N. Booonham, M. V. Marn, I. M. Plesko, V. Molinero-Demilly, X. Tassus, E. Meekes, M. Toonen, L. Papayiannis, Z. Perez-Egusquiza, N. Mehle, C. Jansen, and S. L. Nielsen. 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. J. Virol. Methods 169:207–210.

Mumford, R.A., K. Walsh, and N. Boonham. 2000. A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. Bull. OEPP/EPPO Bull. 30:431–435.

Nagai, A., L. M. L. Duarte, A. L. R. Chaves, L. E. P. Peres, and D. Y. A. C. dos Santos. 2019. Tomato mottle mosaic virus in Brazil and its relationship with Tm–22 gene. Eur J Plant Pathol. 155:353–359.

Navot, J. E., E. Pichersky, M. Zeidan, and D. Zamir. 1991. Tomato Yellow Leaf Curl Virus: A Whitefly-Transmitted Geminivirus with a Single Genomic Component. J. Virol. 185:151–161.

P ´erez-Padilla, V., I. M. Fortes, B. Romero-Rodr ´ıguez, M. Arroyo-Mateos, A. G. Castillo, C. Moyano, L. D. Le ´on, and E. Moriones. 2020. Revisiting seed transmission of the type strain of tomato yellow leaf curl virus in Tomato Plants. Phytopathology 110:121–129.

Querci, M., R. A. Owens, C. Vargas, and L. F. Salazar. 1995. Detection of potato spindle tuber viroid in avocado

growing in Peru. Plant Disease 79:196–202.

Salem, N., A. Mansour, M. Ciuffo, B. W. Falk and M. Turina. 2016. A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. Arch Virol. 161:503–506.

Shamloul, A. M., F. Faggioli, J. M. Keith, and A. Hadidi, A. 2002. A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: Apscaviroid, Hostuviroid, Pelamoviroid, and Pospiviroid. J. Virol. Methods 105:115–121.

Verhoeven, J. T. J., C. C. C. Jansen, T. M. Willemen, L. F. F. Kox, R.A. Owens, and J. W. Roenhorst. 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. European Journal of Plant Pathology 110:823–831.

Welnicki, M., and C. Hiruki. 1992. Highly sensitive digoxigenin-labelled DNA probes for the detection of Potato spindle tuber viroid. J. Virol. Methods 39:91–99.

表 1: 檢疫病毒與類病毒之學名、英名、簡稱、自然寄主與地理分布。

Table 1: Scientific name, English name, abbreviation, natural host and geographical distribution of quarantine virus and viroid.

中名	學名	英名/簡稱	自然寄主	地理分布
馬鈴薯紡錘形塊莖類病毒	*Potato spindle tuber viroid*	potato spindle tuber viroid/ PSTVd	馬鈴薯、番茄、番椒、其他茄科植物、酪梨、菊科的大理花等、甘藷	**歐洲**：荷蘭等 18 國。 **亞洲**：阿富汗、孟加拉、中國、印度、伊朗、以色列、日本、哈薩克、巴基斯坦。 **非洲**：埃及、迦納、肯亞、奈及利亞、烏干達。 **美洲**：哥斯大黎加、多明尼加、墨西哥、祕魯、委內瑞拉。 **大洋洲:** 澳洲。
番茄褪綠矮化類病毒	*Tomato chlorotic dwarf viroid*	tomato chlorotic dwarf viroid/ TCDVd	番茄、茄子	**歐洲**： 捷克、法國、斯洛伐尼亞。 **亞洲**： 印度。 **美洲**： 美國、墨西哥。
金魚藤潛隱類病毒	*Columnea latent viroid*	columnea latent viroid/ CLVd	金魚藤、金魚吊蘭、鴛鴦葉草、大岩桐	**歐洲**：法國、義大利、荷蘭、葡萄牙。 **亞洲**：泰國。 **非洲**：迦納、馬利。 **北美洲**：美國、加拿大、哥斯大黎加。

番椒小果類病毒	*Pepper chat fruit viriod*	pepper chat fruit viriod/ PCFVd	番椒、番茄	**亞洲**：泰國、越南。
番茄莖頂矮化類病毒	*Tomato apical stunt viroid*	tomato apical stunt viroid/ TASVd	番茄、藍花茄、果醬木	**歐洲**：荷蘭等 11 國。 **亞洲**：印尼、以色列。 **非洲**：迦納、塞內、突尼西亞。
番茄植株雄化類病毒	*Tomato planta macho viroid*	tomato planta macho viroid、mexican papita viroid/ TPMVd	番茄、野生馬鈴薯((*Solanum cardiophyllum*)	**美洲**：墨西哥
番茄褐色皺果病毒	*Tomato brown rugose fruit tobamovirus*	tomato brown rugose fruit virus/ ToBRFV	番茄、番椒	**歐洲**：捷克、德國、希臘、義大利、馬爾他、荷蘭、波蘭、土耳其、西班牙、英國。 **亞洲**：中國、以色列、約旦、巴勒斯坦。 **美洲**：美國、墨西哥。
番茄斑駁嵌紋病毒	*Tomato mottle mosaic*	tomato mottle mosaic	番茄、茄子、番椒	**歐洲**：西班牙。 **亞洲**：中國、以色列、伊朗。

	tobamovirus	virus/ ToMMV		**美洲**：美國、墨西哥、巴西。
香瓜茄嵌紋病毒	*Pepino mosaic potexvirus*	pepino mosaic virus/ PepMV	番茄、茄子、香瓜茄、馬鈴薯	**歐洲**：荷蘭等 25 國。 **亞洲**：中國、以色列、敘利亞。 **非洲**：埃及、馬達加斯加、摩洛哥、南非。 **美洲**：加拿大、美國、墨西哥、智利、厄瓜多爾、秘魯。
番茄黃化捲葉病毒	*Tomato yellow leaf curl begomovirus*	tomato yellow leaf curl virus/ TYLCV	番茄、茄子、馬鈴薯、番椒、煙草、酪梨、豆類、矮牽牛、洋桔梗	**非洲：**阿爾及利亞等 17 國。 **歐洲**：法國等 10 國。。 **亞洲**：中國等 21 國。 **美洲**：美國等 15 國。 **大洋洲：**澳洲。

(資料來源：CABI- https://www.cabi.org/isc/datasheet/)

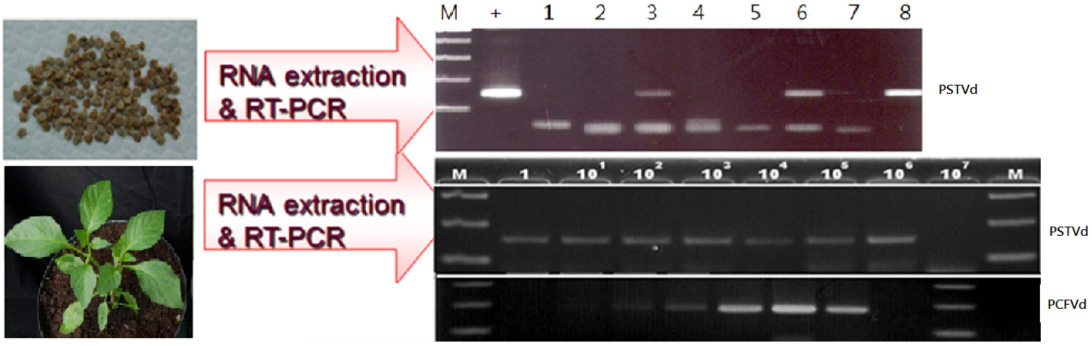

圖 1. 種子經核酸萃取後進行 RT-PCR，種子樣本檢出 PSTVd (上)。接種植株葉片經核酸萃取後進行 RT-PCR，測試反應靈敏度，稀釋 10^6 仍可檢出 PSTVd，稀釋 10^5 仍可檢出 PCFVd (下)。

Fig. 1. RT-PCR and electrophoresis were performed after nucleic acid extraction from seeds, and PSTVd was detected in seed samples (top). The leaves of the inoculated plants were subjected to RT-PCR after nucleic acid extraction to test the sensitivity of the reaction. PSTVd could be detected at a dilution of 10^6, and PCFVd could be detected at a dilution of 10^5 (bottom).

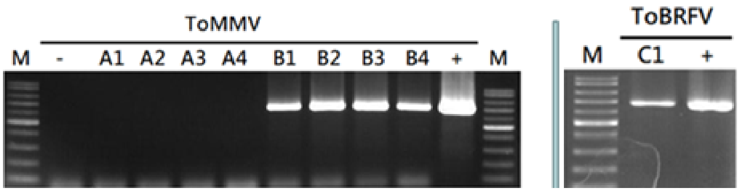

圖 2. 進口種子檢測，自不同輸入國之番茄種子分別檢出ToMMV或ToBRFV。

Fig. 2. Imported seeds were tested, and ToMMV or ToBRFV were detected from tomato seeds of different input batches.

Application of Quarantine Viruses and Viroids of Solanaceae Crops Detection System in Plant Protection and Quarantine

Ying-Huey Cheng[1,*], Ya-Wen Lin[1], Chin-Chih Chen [1], Jau-Yueh Wang [2], and Feng-Chyi Lin [3]

[1]Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[2]Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3]Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

Abstract

Solanaceae plants include many important economic crops such as tomatoes, peppers, eggplants, and potatoes. Many important viruses and viroids are carried and long distance transmission by seeds of Solanaceae crops, causing serious agricultural losses. The international trade in Solanaceae seeds is frequent, and the risk of imported seed-borne virus and viroids from abroad will increase significantly. Base on the results of the risk assessment, The Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine has designated the import quarantine items including six viroids and four viruses for imported Solanaceae seeds and seedlings. Six viroids including potato spindle tuber viroids (PSTVd), tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd), Columnea latent viroid (CLVd), pepper chat fruit viroid (PCFVd), tomato apical stunt viroid (TASVd) and tomato planta macho viroid (TPMVd) and four viruses, including tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), tomato mottle mosaic virus (ToMMV), pepino mosaic virus (PepMV) and tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). The nucleic acid detection system for the aforementioned 10 viruses and viroids has been established by the Agricultural Research Institute. This system is not only used for border detection of imported Solanaceae seeds, but also for field monitoring to completely prevent these important

*Corresponding author.
E-mail: yhcheng@tari.gov.tw

viruses and viroids from entering Taiwan and endanger the agricultural system. These measures will enhance the international competitiveness of Solanaceae seeds and ensure the sustainable development of the industry.

Key words: Solanaceae, potato spindle tuber viroids (PSTVd), tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd), Columnea latent viroid (CLVd), pepper chat fruit viroid (PCFVd), tomato apical stunt viroid (TASVd), tomato planta macho viroid (TPMVd), tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), tomato mottle mosaic virus (ToMMV), pepino mosaic virus (PepMV), tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)